Microtomie et préparation de coupes en paraffine

Scientia

Leica Microsystems' Education Series

Living up to Life

Leica
MICROSYSTEMS

Introduction

La préparation de coupes de grande qualité pour l'histopathologie nécessite compétence et expérience, mais toutes deux peuvent s'acquérir. La présente brochure s'adresse aussi bien aux débutants dans le domaine de la microtomie et de la préparation de coupes en paraffine qu'aux histologistes plus expérimentés. Elle recouvre les éléments essentiels pour paramétrer et utiliser en toute sécurité un microtome à rotation pour préparer des coupes en paraffine. Quelques-unes des erreurs les plus courantes observées dans les coupes y sont illustrées et des solutions sont proposées.

Le microtome photographié dans la présente brochure est un microtome manuel Leica RM2235, mais les suggestions et commentaires fournis peuvent être appliqués aux microtomes à rotation les plus modernes. Une description des caractéristiques mécaniques et de sécurité d'autres modèles de microtome et des consignes d'utilisation figurent dans le mode d'emploi de l'appareil correspondant.

Scientia

Connaissance. Science. Compétence.

La série éducative Scientia de Leica Microsystems s'inscrit dans notre volonté d'améliorer la théorie et la pratique de l'histologie par l'éducation, la formation et le discours scientifique.

Auteur
Geoffrey Rolls

Contributions
Claudia Dorenkamp
Neville Farmer
Jan Minshew
Kerrie Scott-Dowell
Fiona Tarbet

Table des matières

1. Fixation correcte des échantillons 3
2. Traitement correct des tissus 4
3. Enrobage soigneux des échantillons 5
4. Emplacement approprié du microtome 6
5. Respect des dispositifs de sécurité 7
6. Sélection de l'angle de dégagement optimal de la lame 9
7. Augmentation de la durée de vie de la lame 10
8. Orientation appropriée des échantillons 11
9. Les options de votre microtome et leur utilisation. 13
10. Prudence lors des opérations de dégrossissage, de surfaçage ou d'aplanissement 14
11. Prise en compte des facteurs intervenant dans l'épaisseur de la coupe 16
12. Vérification de la température froide des blocs 17
13. Apprentissage de la technique de réalisation de coupes fines et régulières de grande qualité 18
14. Choix des lames et milieux de montage. 19
15. Flottation soigneuse des coupes 20
16. Séchage adéquat des lames 22
17. Nettoyage et maintenance rigoureux du microtome 23
18. Savoir reconnaître et corriger les erreurs courantes. 24

1. Fixation correcte des échantillons

La fixation est l'étape la plus importante dans la réalisation des techniques de préparation des échantillons histologiques. Quel que soit le soin apporté au traitement et à la coupe d'échantillons de tissus, un détail morphologique essentiel ne pourra être mis en évidence que si les tissus ont été fixés rapidement et correctement.

- Les échantillons mal fixés sont presque toujours plus difficiles à couper que ceux qui sont bien fixés.
- Les tissus mals fixés donneront toujours une morphologie de mauvaise qualité même s'ils sont parfaitement traités et soigneusement coupés.

2. Traitement correct des tissus

Un bloc de paraffine sera difficile à couper à moins que l'échantillon ait été traité correctement en suivant un programme approprié.

- Il arrive que les échantillons soient « sous-traités » (trop grands, programme trop court) ou « sur-traités » (programme trop long pour la taille et nature de l'échantillon). Dans les deux cas, il peut être difficile, voire impossible de les couper.
- Il existe de nombreuses techniques pouvant être utilisées pour obtenir des coupes de blocs difficiles.
- Si le bloc est difficile à couper parce que les tissus sont durs ou friables, la surface exposée peut être trempée dans de l'eau froide ou un agent adoucissant tel qu'une solution contenant un peu de détergent, d'assouplissant ou de Mollifex™.
- Pour les échantillons contenant du calcium, l'utilisation d'un agent décalcifiant appliqué aux tissus exposés pendant 10 minutes ou plus peut permettre d'obtenir plusieurs coupes. Bien rincer les blocs avant de les placer dans le porte-échantillon du microtome et de couper à nouveau, car des traces de l'agent décalcifiant endommageraient la plaque de pression du porte-lame.
- Le Leica Paraffin Tape-Transfer System™ est recommandé pour obtenir des coupes à partir de blocs difficiles pour lesquels la fixation, le traitement ou l'infiltration sont peut-être imparfaits et les méthodes de coupe normales n'aboutissent pas.
- Lorsqu'il est impossible d'obtenir des coupes d'un bloc parce que l'échantillon a été sous-traité au départ, il est parfois possible de le retraiter.

Ce bloc de pancréas n'est pas assez fixé et a été traité selon un protocole bien trop court. Il présente les effets types de sous-traitement ayant provoqué un rétrécissement considérable de l'échantillon dans la paraffine environnante. Les tissus étaient doux et mous et impossibles à couper. Ils ont nécessité un nouveau traitement.

3. Enrobage soigneux des échantillons

L'enrobage est une étape importante qui nécessite une approche délicate. Un enrobage bâclé peut rendre la microtomie beaucoup plus difficile.

- Évitez de ne pas assez remplir la cassette, car cela peut se traduire par un mauvais serrage du microtome et entraîner des coupes « épaisses puis fines » et d'autres problèmes.
- Évitez de trop remplir les cassettes car cela peut interférer avec l'alignement de la face du bloc pour la découpe.
- Tout excès de paraffine en dehors de la cassette devra être supprimé avant le serrage afin de garantir que le bloc soit solidement maintenu pendant la découpe.
- L'orientation des échantillons est très importante (voir point 8 page 11).

Exemples de cassettes pas assez (à gauche), trop (à droite) et correctement (au centre) remplies. Des cassettes trop ou pas assez remplies peuvent être la cause de problèmes durant la microtomie.

4. Emplacement approprié du microtome

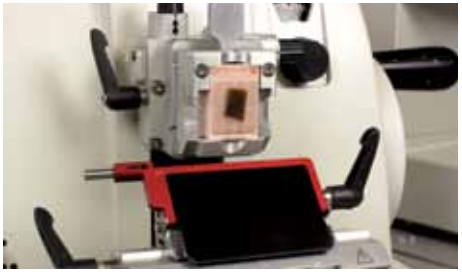
L'emplacement du microtome au sein du laboratoire est important.

- Placez le microtome sur un plan stable, loin des courants d'air, des couloirs et des passages. Tout mouvement d'air provenant de climatiseurs ou autres peut rendre la manipulation de coupes très difficile.
- Un plan adaptable en hauteur et une chaise ergonomique sont recommandés.
- Il est très important que le personnel ne soit pas distrait pendant la manipulation du microtome en raison des risques de blessure avec les lames extrêmement tranchantes. Il faudra tenir compte des possibilités d'interaction avec d'autres membres du personnel lors du choix de l'emplacement des microtomes dans un laboratoire.
- Il est préférable d'avoir un sol non glissant à proximité des microtomes car, inévitablement, des fragments de paraffine vont tomber sur le sol et le rendre glissant. De nombreux laboratoires utilisent des tapis antidérapants pour rendre l'environnement plus sûr.

5. Respect des dispositifs de sécurité

Vous devez connaître les dispositifs de sécurité du microtome que vous utilisez et respecter certaines règles de base lors de la découpe.

- Les couteaux et les lames jetables du microtome sont extrêmement tranchantes et peuvent causer de graves blessures si vous n'y apportez pas d'attention particulière lors de leur manipulation. Les accidents surviennent lorsqu'un microtomiste est distrait et n'est pas pleinement concentré.
- Utilisez des pinces ou un pinceau au lieu de vos doigts pour attraper des coupes ou des fragments de paraffine sur la lame ou la face du bloc.
- Les microtomes à rotation Leica sont équipés d'une garde de sûreté (de couteau ou de doigt), un cran de sûreté et un frein pour le volant pour permettre d'opérer en toute sécurité.
- La garde de sûreté peut être placée de manière à recouvrir la longueur totale du tranchant.
- Le cran de sûreté du volant bloquera la tête de l'objet en haut de la course de travail et doit être utilisé lors du changement de blocs.
- La garde doit être en place et le cran de sûreté du volant enclenché lorsqu'un bloc est mis en place ou retiré de la pince à cassette ou pour toute manipulation du bloc lorsque le couteau ou la lame est en place. La garde doit aussi être utilisée lorsque le microtome est laissé sans surveillance.
- Le frein du volant bloquera le microtome, quelle que soit la position de la poignée, et sera utilisé lors de réalignement d'une face de bloc ou d'adaptation du mouvement d'approche.



La garde de sûreté rouge du microtome Leica RM2235 est rabattue en position sur cette illustration. Elle recouvre entièrement le tranchant de la lame.

Le cran de sûreté du volant est présenté ici enclenché, avec le volant en position de midi. Le cran ne s'enclenchera dans cette position qu'en haut de la course de travail.

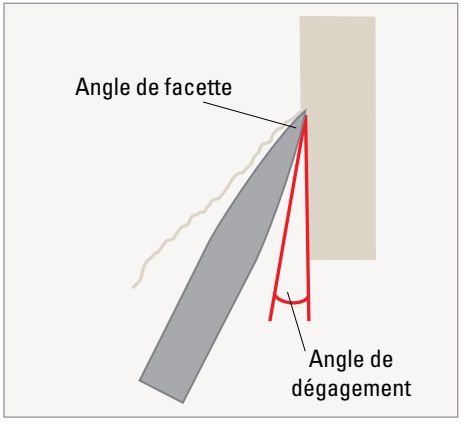
- Le couteau ou la lame seront retirés du microtome lorsque l'appareil sera laissé sans surveillance ou lors du nettoyage de l'appareil. Pour cela, le mieux est de débloquer la lame, utiliser ensuite l'éjecteur de lame sur le côté gauche de la garde et retirer la lame latéralement du support. Elle peut ensuite être saisie à l'aide d'une pince (pas avec les doigts) ou soulevée avec l'aimant au bout du pinceau Leica et retirée en toute sécurité. Les lames usagées devront être éliminées de manière appropriée dans un récipient à « objets coupants » ou dans le logement « lames usagées » à la base du distributeur de lames.
- Ne posez jamais un couteau ou une lame avec le tranchant orienté en haut sur le plan de travail ou dans une boîte. Si une lame vous échappe, laissez la tomber. N'essayez en aucun cas de la rattraper (réflexe spontané à réprimer).

Le frein du volant du Leica RM2235 est présenté ici en position verrouillée. Le frein peut être actionné quelle que soit la position du volant. Le cran de sûreté ou le frein peut être utilisé afin d'immobiliser le microtome.

6. Sélection de l'angle de dégagement optimal de la lame

L'angle de dégagement de la lame peut être adapté et doit être défini pour une performance optimale.

- L'angle de dégagement empêche le contact entre la facette du couteau et la face du bloc.
- L'angle de facette est l'angle compris entre les deux facettes formant le tranchant. Pour un usage en routine, les couteaux et lames jetables sont réalisés avec un angle de facette d'environ 35°, mais cet angle peut varier avec le type de lame et selon le fabricant.
- Aussi, pour chaque type de lame, l'angle de dégagement doit être réglé de manière optimale.
- Suivez les directives du fabricant de microtomes pour le paramétrage recommandé de l'angle. Pour les porte-couteaux et porte-lames Leica, on recommande un angle entre 1° et 5°[1].



7. Augmentation de la durée de vie de la lame

Il existe quelques stratégies simples pour augmenter la durée de vie de chaque lame.

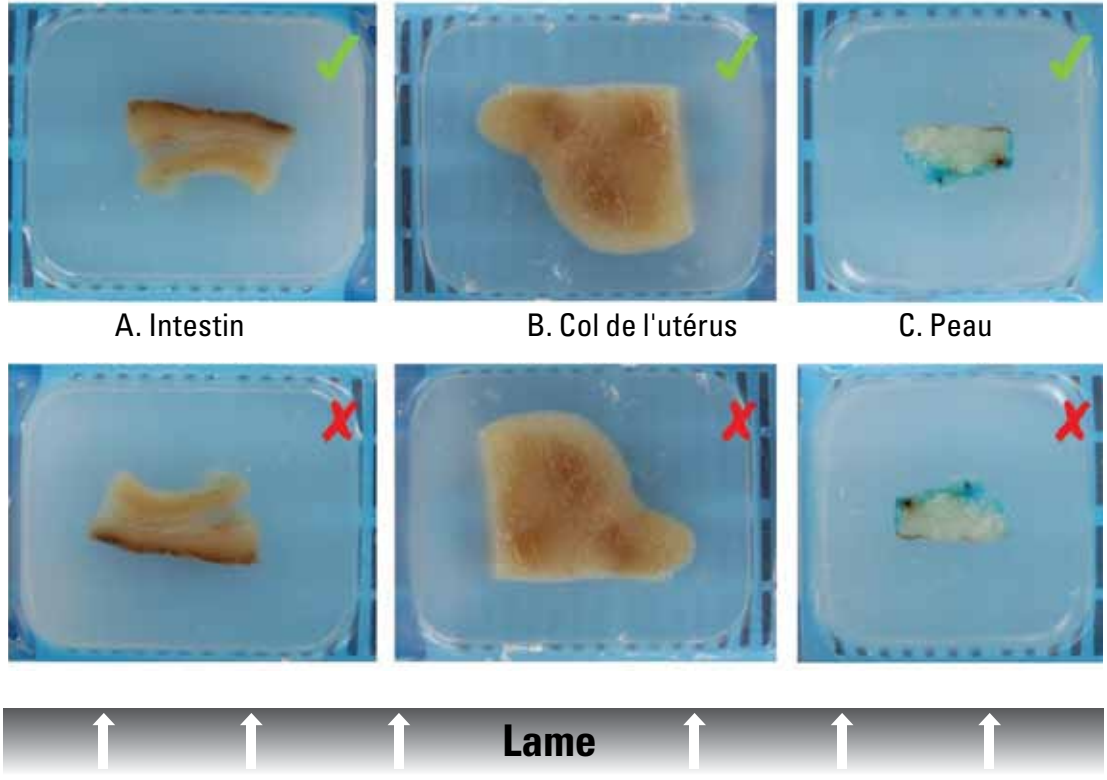
- Lors du nettoyage de la lame, évitez de frotter quoi que ce soit le long du tranchant. Même les fibres de cellulose peuvent endommager la lame.
- Évitez de toucher le tranchant avec tout objet dur tel que les pinces ou le pinceau.
- Utilisez la lame systématiquement, en travaillant d'un bout à l'autre. Vous tirerez ainsi le maximum de chaque partie de la lame.
- Utilisez une partie de la lame pour dégrossir et l'autre pour la coupe finale ou utilisez des lames différentes pour chacune des deux procédures.
- Un microtome à rétraction prolonge la durée de vie de la lame en retirant l'échantillon de la lame dans sa course ascendante et en empêchant la formation de débris au dos de la lame.

8. Orientation appropriée des échantillons

L'orientation de l'échantillon par rapport à la lame pendant la course de travail peut affecter la facilité d'obtention d'un ruban et peser directement sur la qualité de la coupe.

- Dans la plupart des laboratoires, toutes les cassettes sont placées dans la pince à objet suivant la même orientation (p. ex. étiquette à gauche pour une orientation est-ouest ou étiquette en haut pour une orientation nord-sud). Cela permet de faciliter l'aplanissement de plusieurs blocs avant de préparer les coupes de grande qualité et d'effectuer des coupes ou des reprises de coupe plus profondes sans perte excessive de tissus. L'orientation de l'échantillon par rapport à la lame doit de ce fait être prise en compte **à l'étape de l'enrobage. Cette nécessité est souvent négligée.**
- L'illustration de la page 12 présente l'orientation recommandée pour certains échantillons types. Les avis divergeront sur la meilleure orientation à choisir pour certains échantillons types, mais l'orientation est un point important qui doit être pris en compte.
- Exemple A. Intestin : la lame passe à travers la muqueuse en dernier
- Exemple B. Col de l'utérus : il vaut mieux présenter à la lame des tissus épais que plats.
- Exemple C. Peau : la lame passe à travers l'épiderme en dernier.
- Les microtomes tels que le Leica RM2235 ont également un dispositif d'orientation précise avec des contrôles de calibrage qui permettent de trouver facilement la position zéro ou une variable mesurable sur l'axe x/y. Cette fonction est très utile lors de la reprise d'une coupe de blocs préparés dans d'autres laboratoires ou avec d'autres microtomes pour lesquels un alignement précis est nécessaire pour éviter une perte inutile de tissus. Pour un usage en routine lors de découpe de plusieurs blocs, il est important que le porte-échantillon soit en position zéro pour les deux

axes avant de commencer la découpe. Grâce aux indicateurs (rouge), aux points d'encoche (crans) et aux repères des indicateurs, c'est facilement réalisable.



9. Les options de votre microtome et leur utilisation

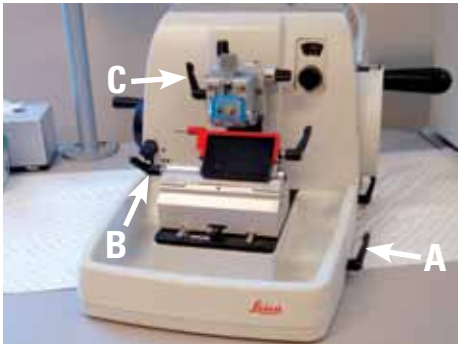
Les microtomes à rétraction sont conçus de manière à ce que l'échantillon soit éloigné de la lame dans sa course ascendante. Il est important de savoir si votre microtome présente cette fonctionnalité.

- La rétraction est une fonction qui présente différents avantages pendant la découpe et prolonge la durée de vie de la lame.
- Lors d'utilisation d'un microtome à option de rétraction, l'alignement de la face du bloc au tranchant doit être effectué lorsque le bloc est en course descendante (en position avant, non rétractée).
- Si un bloc est aligné près du tranchant tandis que le bras de l'échantillon est rétracté, lors de la prochaine révolution complète du volant, le bloc avancera de la valeur de rétraction plus l'épaisseur de coupe sélectionnée. Il en résultera une tranche épaisse qui pourrait endommager à la fois l'échantillon et la lame.
- Les microtomes peuvent aussi être manuels, semi-motorisés ou entièrement motorisés.
- Les appareils motorisés réduisent les mouvements répétitifs qui peuvent favoriser des troubles musculo-squelettiques.

10. Prudence lors des opérations de dégrossissage, de surfaçage ou d'aplanissement

Cette étape de la microtomie nécessite une grande méticulosité car des tissus essentiels en termes de diagnostic peuvent être facilement perdus ou la surface du bloc peut être endommagée.

- Avant de commencer le dégrossissage, vérifiez toujours que tous les mécanismes de serrage sont solidement fixés.
- L'objectif du dégrossissage d'un bloc est de dénuder les tissus jusqu'à un niveau pour lequel on pourra obtenir une coupe représentative.
- Le dégrossissage est généralement effectué à des épaisseurs de 10 à 30 µm.
- Le dégrossissage en course rapide de tissus fragiles risque d'endommager la surface de l'échantillon[2]. Soyez particulièrement prudent lorsque vous utilisez le dispositif de dégrossissage mécanique à 30 µm.
- Enfin, polissez la face du bloc en réalisant doucement quelques coupes fines. Cela permettra d'éviter le problème illustré au point 18B à la page 24.



La pince de l'embase du porte-couteau A, la pince de déplacement latéral B et la pince d'orientation x-y C devront être solidement verrouillées avant le dégrossissage du bloc. Sinon, le bloc et la lame pourraient être endommagés.

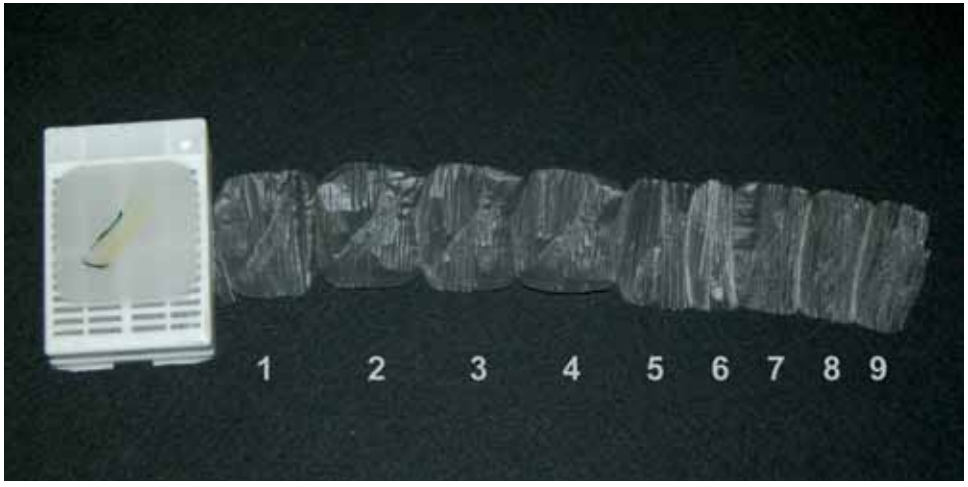
Le dispositif de dégrossissage mécanique devra être utilisé avec précaution lors de l'aplanissement, surtout dans sa configuration la plus basse (..) qui produit des avancées de 30 µm lorsqu'elle est activée.

Le volant du mouvement d'approche doit être utilisé avec précaution pour éviter la découpe accidentelle de tranches épaisses à la surface de l'échantillon et tout dommage.

11. Prise en compte des facteurs intervenant dans l'épaisseur de la coupe

Configurez le microtome selon l'épaisseur désirée mais notez qu'il existe un certain nombre de facteurs déterminant l'épaisseur réelle de la coupe.

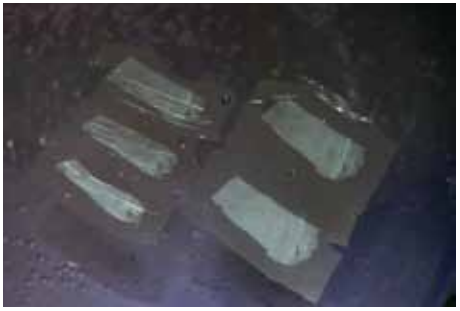
- Une coupe homogène de 4 µm peut délivrer plus d'informations qu'une coupe très dissociée de 2 µm.
- L'épaisseur réelle des premières coupes dans un ruban peut être plus importante qu'indiquée à cause de la dilatation thermique[3,4] lors de la découpe d'un bloc froid (comme le montrent les coupes 1, 2 et 3 ci-dessous).
- D'autres facteurs tels que la vitesse de rotation, le réglage de l'angle de dégagement et l'état du tranchant peuvent influencer l'épaisseur réelle obtenue.



12. Vérification de la température froide des blocs

La découpe est généralement améliorée lorsque l'échantillon et la paraffine présentent une dureté comparable. C'est la raison pour laquelle la plupart des blocs de paraffine doivent être froids pour la réalisation des coupes. La méthode effectivement utilisée pour refroidir le bloc est importante.

- La paraffine froide constitue un meilleur support pour les éléments durs dans un échantillon, avec à la clé des coupes plus fines.
- Placez les blocs sur une plaque froide ou une surface froide **humide** (telle que la surface de glace fondante) pendant quelques minutes.
- L'eau pénètre légèrement dans la face du bloc, faisant gonfler les tissus qui se prêtent mieux à une découpe. Ceci est particulièrement important pour les tissus extrêmement déshydratés, secs ou friables.
- Mettre les blocs au congélateur peut faire craquer la surface, ce, à la limite des tissus avec la paraffine environnante. Cela peut rendre l'obtention de coupes homogènes plus difficile.

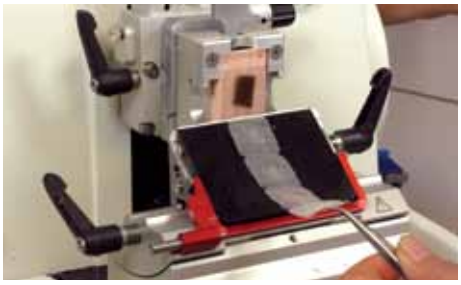


Les coupes à gauche ont été réalisées à partir d'un bloc relativement chaud sans refroidissement. Les coupes à droite ont été effectuées à partir du même bloc après refroidissement à la surface de glace fondante.

13. Apprentissage de la technique de réalisation de coupes fines et régulières de grande qualité

Rien ne saurait remplacer l'expérience mais il existe quelques étapes fondamentales qui rendront la tâche plus facile.

- Utilisez une lame qui n'a pas servi pour le dégrossissage brut.
- Lorsque vous utilisez le mouvement d'approche, évitez de réaliser des coupes épaisses accidentelles car cela abîmera votre couteau et peut-être la face du bloc.
- Un nouveau refroidissement du bloc peut être nécessaire si la face du bloc devient chaude ou si des niveaux plus profonds sont requis.
- Généralement, une course lente et uniforme donne les meilleurs résultats et une compression moindre.
- Ne vous arrêtez pas et ne repartez pas pendant la course car cela produirait des bandes de différentes épaisseurs dans la coupe.
- Souffler doucement sur la face d'un bloc refroidi immédiatement avant la réalisation de chaque coupe est une pratique commune dans certains laboratoires. L'application d'un souffle chaud, humide, a tendance à rendre les coupes plus homogènes mais génère également une dilatation thermique qui rend la coupe plus épaisse[3].
- Des débris collés aux bords supérieurs ou inférieurs du bloc, ou au dos de la lame peuvent rendre l'obtention de rubans homogènes difficile et, faire décoller le ruban de la lame dans la course ascendante. Si des débris sont présents, retirez-les, refroidissez à nouveau le bloc et recommencez.



Ce ruban a été découpé en utilisant une course lente et stable à partir d'un bloc minutieusement refroidi et bien traité. Les coupes montrent une compression très faible même avant la flottation.

14. Choix des lames et milieux de montage

Le choix des lames et du milieu de montage sera influencé par les méthodes de coloration à appliquer par la suite.

- Les lames doivent toujours être dénuées de graisse et de poussière, et stockées et manipulées correctement.
- Si la coloration comprend la recherche des antigènes (IHC), un prétraitement enzymatique (ISH) ou des étapes d'incubation prolongées, des lames chargées ou un milieu de montage telle que l'aminoalkylsilane (AAS) doit être utilisée. Certains colorants spéciaux, surtout ceux employant des réactifs alcalins, peuvent également provoquer le décollage des coupes.
- Les lames doivent toujours être précisément et convenablement étiquetées conformément à la réglementation locale.

15. Flottation soigneuse des coupes

La flottation devrait redonner à la coupe ses dimensions originales et garantir qu'elle soit complètement plate.

- Contrôlez attentivement la température. La température devra être de 5 - 9 °C au-dessous du point de fusion de la cire.
- Vérifiez que l'eau est propre, sans bulles ni déchets de coupe (pour éviter une contamination croisée).
- Placez les coupes côté lisse (brillant) en bas.
- Posez les coupes à la surface de l'eau par un léger mouvement de balayage.
- Les coupes peuvent être très facilement endommagées lors de tentative de retrait de plis ou bulles avec un pinceau ou des pinces.
- Examinez chaque coupe flottant à la surface de l'eau, les imperfections pouvant être facilement repérées.
- Laissez la coupe à la surface de l'eau juste le temps nécessaire pour l'aplanir. Une dilatation trop importante peut abîmer la morphologie lors de coupes sensibles.
- Pour favoriser un drainage efficace et éviter que la coupe glisse de la lame, retirer les lames verticalement de l'eau.

- Avant de placer les lames à l'étuve, égouttez-les brièvement verticalement pour retirer l'excédent d'eau.
- Écumez la surface de l'eau avec un papier non pelucheux entre les blocs pour éviter l'éventualité d'une contamination croisée.
- Pour éviter tout risque de mélange, faites flotter les coupes d'un seul bloc à la fois.

Les coupes de deux blocs différents ne doivent pas flotter simultanément. Même si les échantillons sont de type différent, il y a un risque de contamination croisée et de confusion pouvant entraîner une mauvaise identification. Une telle pratique devra toujours être évitée.

16. Séchage approprié des lames

Un séchage approprié garantit que les coupes sont complètement déshydratées, n'ont pas subi de dommage thermique, sont plates et ne se décolleront pas pendant la coloration.

- Égouttez l'excédent d'eau sous la coupe avant le séchage. Ceci est essentiel lorsque les lames sont séchées à plat sur une plaque chaude[5].
- Les lames peuvent être rangées dans des racks en position droite, puis séchées à l'étuve.
- Généralement, les températures ne devront pas excéder 65 ˚C.
- La chaleur excessive peut faire bouillir des gouttelettes d'eau sous une coupe, ce qui l'endommagera.
- Séchez les coupes pendant 10 à 30 minutes.
- Certains échantillons délicats donneront de bons résultats s'ils sont séchés à 37 ˚C pendant une durée prolongée (de quelques heures à toute une nuit).

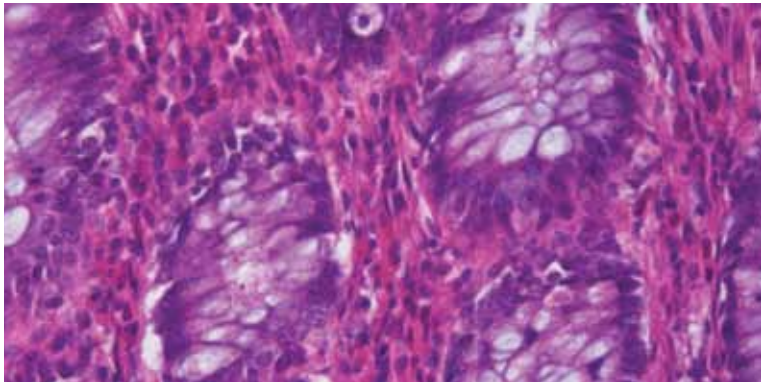
17. Nettoyage et maintenance rigoureux du microtome

Il est important de retirer les débris de tissus et de paraffine accumulés après usage. Une maintenance régulière préventive est essentielle.

- Nettoyez l'appareil tous les jours.
- Retirez toujours le couteau ou la lame avant de nettoyer.
- Le porte-couteau peut facilement être retiré afin de faciliter l'accès au nettoyage.
- Les déchets de coupe seront retirés à l'aide d'un pinceau sec.
- Ne nettoyez pas les surfaces externes avec de l'alcool ou du xylène, car elles ne sont pas résistantes à ces solvants et toute exposition au xylène est à éviter. Les détergents pour paraffine, les nettoyants ménagers doux ou de l'eau savonneuse sont recommandés.
- Aucun liquide ne doit pénétrer à l'intérieur de l'appareil pendant le nettoyage.
- Faites contrôler l'appareil au moins une fois par an par un technicien qualifié.
- Respectez les instructions de lubrification de votre mode d'emploi et utilisez les lubrifiants recommandés.

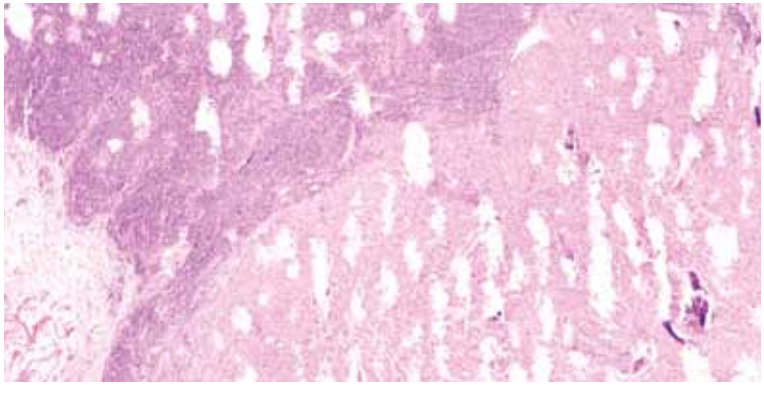
18. Savoir reconnaître et corriger les erreurs courantes

Voici quelques-unes des erreurs les plus courantes concernant les coupes incluses en paraffine :



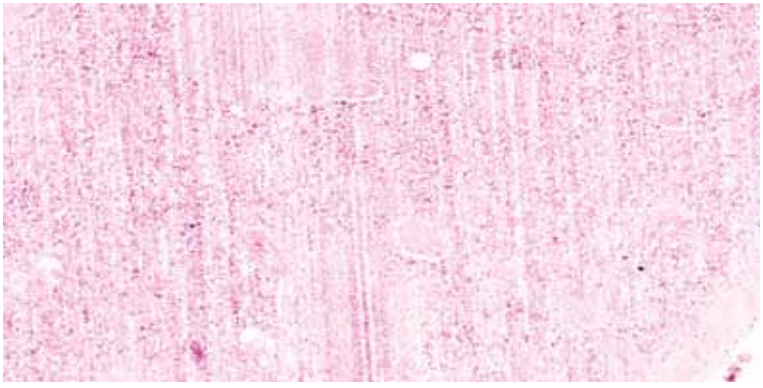
A. Coupe trop épaisse

- Mauvais paramétrage du micromètre
- Souffle chaud appliqué à un bloc froid pour faciliter la découpe
- Première coupe du ruban choisie
- Découpe à trop grande vitesse
- Mauvais traitement
- Le microtome doit être recalibré



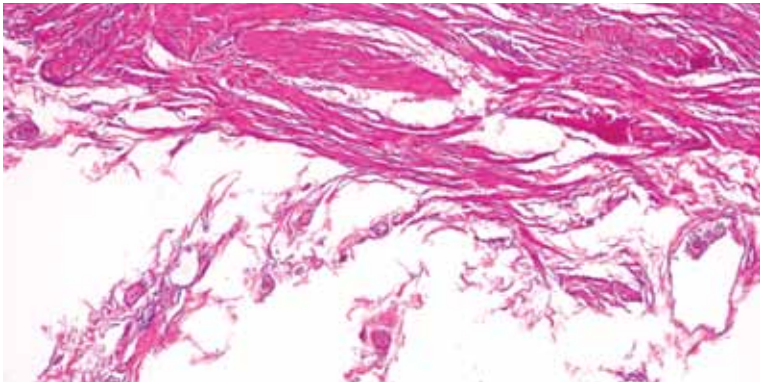
B. Trous dus à un dégrossissage grossier

- Bloc dégrossi trop rapidement
- Surface du bloc non polie en coupant quelques fines coupes après aplanissement
- Épaisseur de coupe inappropriée lors du dégrossissage
- Bloc cassant (trop traité ?) ou trop froid lors du dégrossissage



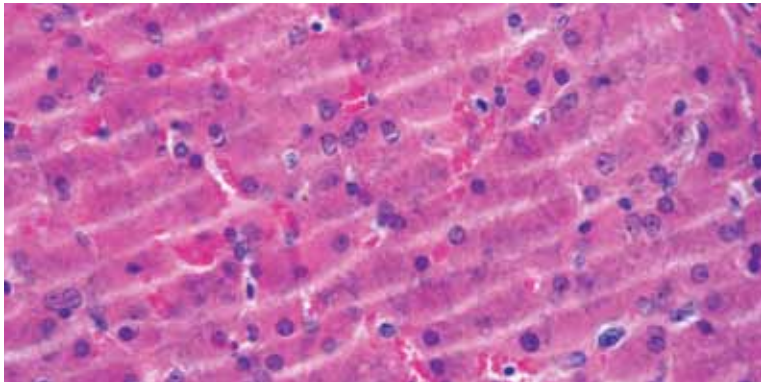
C. Rainures de couteau (stries verticales dans la coupe)

- Couteau endommagé ou lame usée
- Mauvais traitement
- Matériel dur tel que du calcium dans le bloc
- Débris dans la cire non filtrée
- Sels tampons précipités dans les échantillons



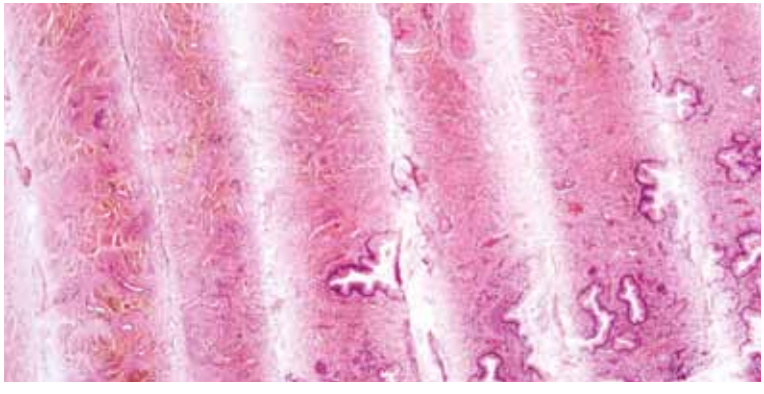
D. Dissociation

- Manipulation grossière des échantillons pendant le montage
- Mauvais traitement (déshydratation, clarification ou infiltration incomplète)
- Traitement vigoureux pour enlever les plis lors de la flottation
- Flottation trop longue ou utilisant de l'eau trop chaude



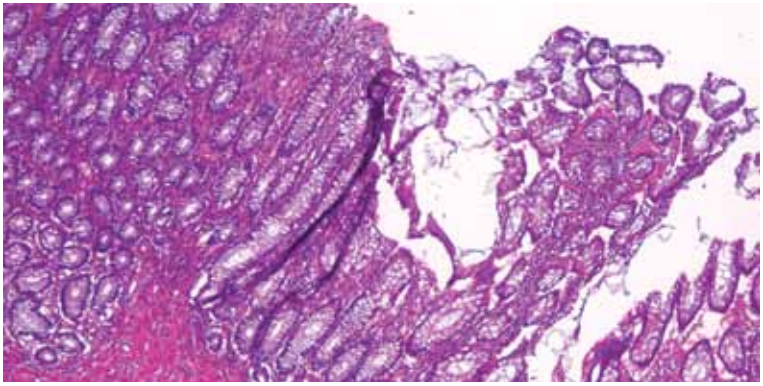
E. Fines fissures ou micro-craquelures

- Tissus trop traités
- Bloc trop froid
- Découpe trop rapide
- Mécanisme de pince pas solidement verrouillé
- Angle de dégagement doit être adapté



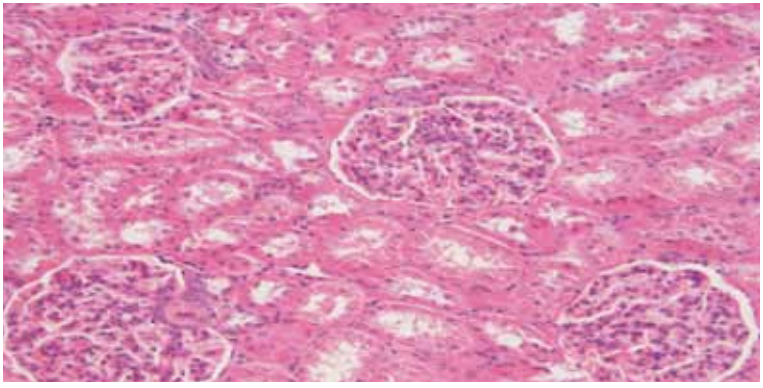
F. Grosses craquelures

- Mécanisme de pince pas solidement verrouillé
- Échantillon très dur ou volumineux
- Mauvais traitement
- Angle de dégagement insuffisant
- Découpe trop rapide
- Microtome usé



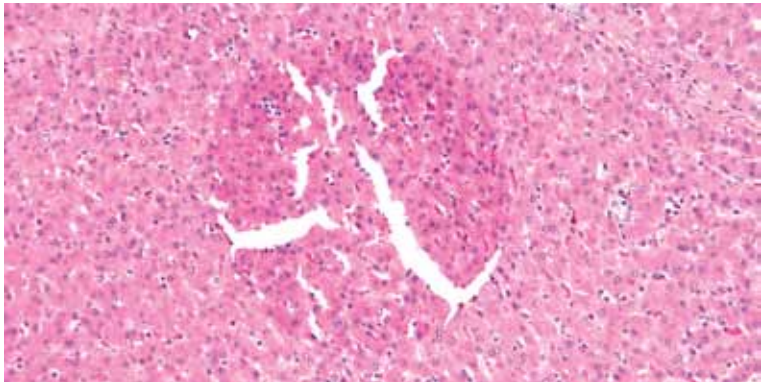
G. Plis

- Mauvaise technique de flottation
- Mauvaise fixation et/ou traitement (support insuffisant)
- Bloc chaud
- Coupe trop fine
- Angle de dégagement trop grand
- Eau du bain trop chaude



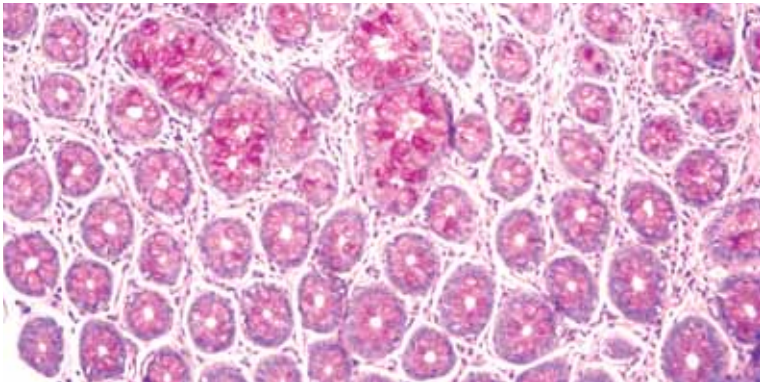
H. Compression excessive

- Mauvais traitement (support insuffisant)
- Bloc chaud
- Découpe trop rapide
- Tranchant émoussé
- Angle de dégagement trop grand
- Mauvaise qualité de paraffine



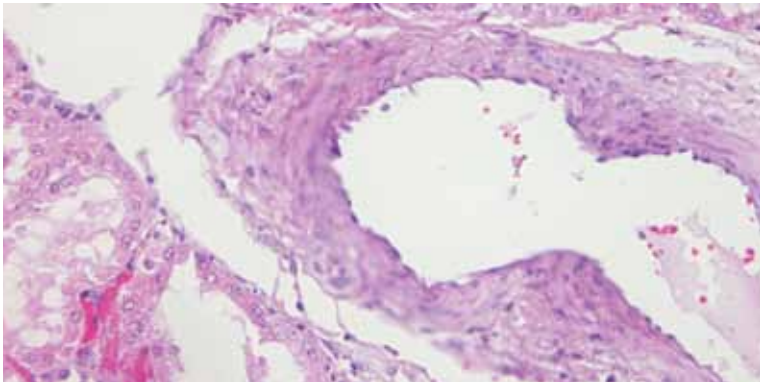
I. Bulles sous la coupe

- Présence de bulles à la base et sur les côtés du bain
- Mauvaise technique de flottation capturant des bulles sous la coupe



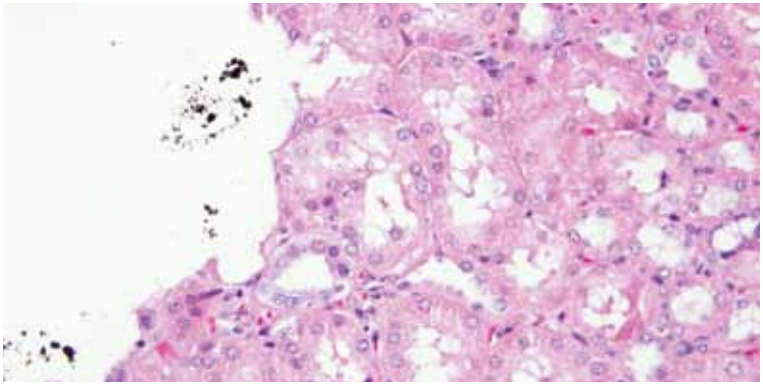
J. Dilatation excessive pendant la flottation

- Température du bain trop élevée
- Coupe laissée trop longtemps sur l'eau
- Mauvaise fixation et/ou traitement (solvant résiduel)



K. Coupe non plane (faible adhérence)

- Coupe de mauvaise qualité (plis, bulles)
- Bain de flottation trop froid
- Utilisation d'une lame non revêtue
- Coupe non soigneusement égouttée après flottation
- Temps de séchage insuffisant
- Température de séchage trop basse



L. Présence de poussière

- Lame sale
- Bain de flottation non écumé ou contaminé
- Lames égouttées, séchées ou rangées dans un environnement poussiéreux
- Fragments de crayon provenant de l'étiquetage

Références

1. Leica Microsystems. Instruction Manual Leica RM2235 V1.3 Nussloch: Leica Microsystems, 2008.
2. Rolls GO, Farmer NJ, Hall JB. Artifacts in Histological and Cytological Preparations. Melbourne: Leica Microsystems, 2008;106.
3. Rolls G. 101 Steps to Better Histology. Melbourne: Leica Microsystems, 2008.
4. Culling CFA, Allison RT, Barr WT. Cellular Pathology Technique. 4e ed. Londres: Butterworths, 1985.
5. Santoianni RA, Hammami A. Nuclear Bubbling an Overlooked Artifact. The Journal of Histotechnology, 1990;13;135-136.

« Avec l'utilisateur, pour l'utilisateur »
Leica Microsystems

Active mondialement

Australie :	North Ryde	Tél. +61 2 8870 3500	Fax +61 2 9878 1055
Autriche :	Vienne	Tél. +43 1 486 80 50 0	Fax +43 1 486 80 50 30
Belgique :	Groot Bijgaarden	Tél. +32 2 790 98 50	Fax +32 2 790 98 68
Canada :	Richmond Hill/Ontario	Tél. +1 905 762 2000	Fax +1 905 762 8937
Danemark :	Ballerup	Tél. +45 4454 0101	Fax +45 4454 0111
France :	Nanterre Cedex	Tél. +33 811 000 664	Fax +33 1 56 05 23 23
Allemagne :	Wetzlar	Tél. +49 64 41 29 40 00	Fax +49 64 41 29 41 55
Italie :	Milan	Tél. +39 02 574 861	Fax +39 02 574 03392
Japon :	Tokyo	Tél. +81 3 5421 2800	Fax +81 3 5421 2896
Corée :	Séoul	Tél. +82 2 514 65 43	Fax +82 2 514 65 48
Pays-Bas :	Rijswijk	Tél. +31 70 4132 100	Fax +31 70 4132 109
Rép. populaire de Chine :	Hong-Kong	Tél. +852 2564 6699	Fax +852 2564 4163
Portugal :	Lisbonne	Tél. +351 21 388 9112	Fax +351 21 385 4668
Singapour :		Tél. +65 6779 7823	Fax +65 6773 0628
Espagne :	Barcelone	Tél. +34 93 494 95 30	Fax +34 93 494 95 32
Suède :	Kista	Tél. +46 8 625 45 45	Fax +46 8 625 45 10
Suisse :	Heerbrugg	Tél. +41 71 726 34 34	Fax +41 71 726 34 44
Royaume-Uni :	Milton Keynes	Tél. +44 1908 246 246	Fax +44 1908 609 992
États-Unis :	Bannockburn/Illinois	Tél. +1 847 405 0123	Fax +1 847 405 0164

et des agences dans plus de 100 pays

www.leica-microsystems.com

Leica
MICROSYSTEMS

Order no.: **Français 11924213** - 03/2010 - 95.9582 Rev A
LEICA and the Leica Logo are registered trademarks of Leica Microsystems IR GmbH.